

**ОЦЕНКА ОПЛОДОТВОРЯЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ  
СПЕРМАТОЗОИДОВ И СЛУЧАЙ ГЕРМАФРОДИТИЗМА  
У ОЗЕРНОЙ ЛЯГУШКИ  
(*PELOPHYLAX RIDIBUNDUS*, PALLAS, 1771) В УСЛОВИЯХ  
АНТРОПОГЕННО-ИЗМЕНЕННЫХ ЛАНДШАФТОВ**

**Е. А. Байtimiрова, В. Л. Вершинин**

Институт экологии растений и животных УрО РАН  
(Екатеринбург)

**THE ASSESSMENT OF IMPREGNATING SPERMATOZOID  
CAPACITY AND INCIDENT OF HERMAPHRODITISM  
IN MARSH FROG (*PELOPHYLAX RIDIBUNDUS*, PALLAS, 1771)  
IN ANTHROPOGENICALLY MODIFIED LANDSCAPES**

**E. A. Baytimirova, V. L. Vershinin**

Institute of Plant & Animal ecology, Russian Academy of Science,  
Ural division (Ekaterinburg)

*An assessment of impregnating spermatozoid capacity and histological examination of the testes in order to detect the lake frog oocytes in anthropogenically-modified landscapes. Males have the smallest size of the sperm heads in populations from the most transformed areas. Presence of oocytes in the tissue of the hermaphrodite's testis were revealed.*

*Проведена оценка оплодотворяющей способности сперматозоидов и гистологическое исследование семенников на предмет наличия ооцитов у озерной лягушки в популяциях антропогенно-модифицированных ландшафтов. Наименьший размер головок сперматозоидов отмечен у самцов из популяций наиболее трансформированных территорий. Отмечено наличие ооцитов в тканях семенников гермафродитной особи.*

В последнее время в литературе большое внимание уделяется влиянию на амфибий веществ, вызывающих эндокринный дисбаланс (эндокринных дизрапторов – endocrine disruptors). Способность связываться с рецепторами стероидных гормонов обусловлена структурным сходством ряда поллютантов (пестицидов, гербици-

дов, полихлорированных бифенилов и пр.) с фенолами [Никитин, 2008]. Их воздействие может приводить к отклонениям в гормональной регуляции репродуктивной функции и появлению интерсексуальных особей, характеризующихся одновременным присутствием женских и мужских признаков.

Примерно с середины прошлого века стало наблюдаться сокращение численности популяций многих видов амфибий. Это явление многие авторы связывали с нарушением полового развития, вызванным действием гормональных дизрапторов. Интерес к появлению интерсексуальных особей среди лягушек значительно возрос после публикаций о ненормальном сексуальном развитии, связанном с воздействием сельскохозяйственных гербицидов, таких как атразин [Hayes et al., 2003; McDaniel et al., 2008; Hecker et al., 2004; Murphy et al., 2006; Smith et al., 2005; Du Preez et al., 2009; Reeder et al., 1998]. При этом в литературе преобладают данные о присутствии ооцитов в ткани семенника. Некоторыми авторами было показано, что частота встречаемости ооцитов в семенниках амфибий в городских районах значительно выше по сравнению с сельскохозяйственными и районами без антропогенной нагрузки [Skelly et al., 2010].

Тем не менее в настоящее время интерпретация результатов исследований по действию на амфибий эндокринных деструкторов затрудняется из-за недостаточной изученности внутри- и межвидовых изменений в половой дифференциации, темпов развития, колебания уровней загрязнителей и отсутствия стандартизированных экспериментов для целей сравнения. Кроме того, у некоторых видов амфибий было показано не зависящее от загрязнений перепределение пола [Storrs-Mendez and Semlitsch, 2010]. Установление связи между интерсексуальностью и плодовитостью половозрелых лягушек, несомненно, нуждается в дополнительных исследованиях.

Причиной проведения данного анализа послужила поимка в 2012 г. на территории ЦПКиО в Екатеринбурге особи озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus*, Pallas, 1771), которая имела вторичные половые признаки самца (брачные мозоли). При вскрытии были обнаружены признаки гермафродитизма: одновременное присут-

ствие семенников и яичников. Поскольку ранее подобные особи в выборках не отмечались, была проведена оценка оплодотворяющей способности сперматозоидов и гистологическое изучение семенников с целью обнаружения ооцитов у озерной лягушки в условиях антропогенно-измененных ландшафтов.

### **Материал и методы**

Дегенеративные процессы в семенных канальцах могут привести к формированию патологических и атипичных полиморфных сперматозоидов, которые не способны участвовать в оплодотворении. Одним из основных показателей оплодотворяющей способности сперматозоидов является размер головки. Вариабельность сперматозоидов по величине головки связана с различным содержанием в них ДНК, а также с особенностями конденсации и упаковки хроматина, определяющими степень зрелости сперматозоидов [Мамина, Жигальский, 2006].

В работе проведено изучение количества аномальных сперматозоидов озерной лягушки в 1 мм<sup>2</sup> мазкового препарата семенника и измерение площадей головок сперматозоидов. На серийных срезах семенников животных проведено исследование относительно присутствия ооцитов в ткани семенников.

В работе исследовались половозрелые самцы озерной лягушки (таблица), отловленные в двух местообитаниях на территории Екатеринбурга с разным уровнем антропогенной нагрузки. В соответствии с выработанной ранее типизацией [Вершинин и др., 2006] район ЦПКиО был отнесен к зоне малоэтажной застройки, лесопарк Калиновские разрезы – к лесопарковой зоне. В градиенте урбанизации отмечено увеличение общей минерализации, содержания хлорид- и сульфат-ионов, повышение эвтрофикации водоемов, изменение pH среды с кислой на нейтральную [Вершинин и др., 2006]. Вода в р. Малая Кушва, которая протекает по территории Нижнего Тагила, характеризуется специфическим загрязнением (превышение ПДК по нефтепродуктам в 12 раз, по фенолам – до 5 раз, по марганцу – в 3 раза) и относится к чрезвычайно грязным. Поступающие в реку нагретые сточные воды формируют тепловое загрязнение реки.

### Исследуемый материал

Дата отлова	Место отлова	Количество, шт.
29.08.2009 г.	ЦПКиО, Екатеринбург	6
03.07.2012 г.	ЦПКиО, Екатеринбург	10
30.07.2009 г.	Лесопарк Калиновские разрезы, Екатеринбург	6
04.09.2009 г.	Р. Малая Кушва, Нижний Тагил	5

### Результаты и обсуждение

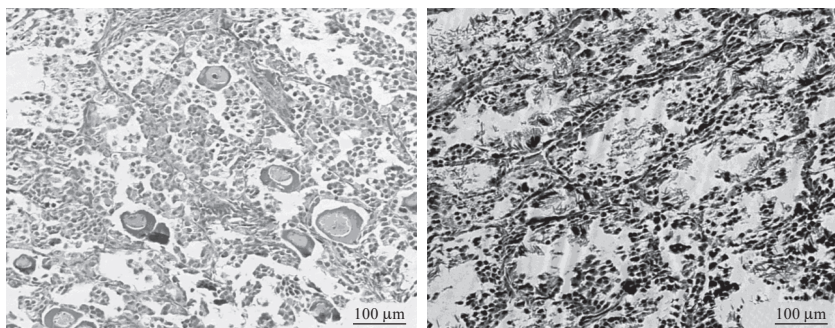
Статистический анализ полученных данных по количеству аномальных (измененная форма головки) сперматозоидов в 1 мм<sup>2</sup> мазкового препарата семенника в зависимости от уровня антропогенной нагрузки не выявил значимых различий (Kruskal Wallis Test,  $p > 0,05$ ). В целом количество аномальных сперматозоидов у животных не превышает 7 % в лесопарке, 3 % в ЦПКиО и 4 % в окрестностях р. М. Кушва.

При морфометрическом исследовании сперматозоидов озерной лягушки нами установлено, что размер головки сперматозоида варьирует от 20,1 до 68,1 мкм<sup>2</sup>. При анализе изменчивости площади головки сперматозоидов у озерной лягушки был использован однофакторный дисперсионный анализ. Показано, что головки сперматозоидов у озерных лягушек, населяющих лесопарк, статистически значимо больше в сравнении с лягушками других изучаемых районов. Средние значения площади головки сперматозоида в ЦПКиО, лесопарке Калиновские разрезы, окрестностях р. М. Кушва составили соответственно (среднее  $\pm$  ошибка среднего):  $38,31 \pm 0,44$  /  $39,01 \pm 0,31$  /  $40,51 \pm 0,73$  ( $F(2, 514) = 4,25, p = 0,01$ ). Наименьшая площадь головок, таким образом, отмечена в районе поймки гермафродитной особи – в ЦПКиО.

Дегенеративные изменения в герминативном отделе семенника вызывают элиминацию и дегенерацию хромосом, в результате чего образуются сперматозоиды с недостаточным содержанием хроматина (с малым размером головки) [Мамина, Жигальский,

2006]. Причиной появления подобных сперматозоидов могут быть нарушения деления сперматоцитов в семеннике, которые приводят к образованию многоядерных клеток. Можно сделать предположение, что самцы озерных лягушек, обитающие в ЦПКиО, обладают наименьшей оплодотворяющей способностью сперматозоидов.

При изучении гистологической структуры семенников животных ооциты были обнаружены только в ткани семенника гермафродита (рисунок). При этом ооциты были видны на срезах только в верхней части семенника. Наряду с присутствием ооцитов в этой части органа отсутствовали семенные каналы, содержащие сперматозоиды. На срединных срезах органа присутствия ооцитов в ткани семенника не наблюдалось. Семенные каналы содержали все типы клеток, включая сперматозоиды. В ткани других половозрелых самцов, отловленных на территории ЦПКиО, ооцитов обнаружено не было.



*a*

*б*

Поперечный срез семенника озерной лягушки (гермафродит) ув.  $\times 100$ :

*a* – верхняя часть органа, в семенных каналах помимо клеток сперматогенного эпителия присутствуют ооциты; *б* – срединный срез органа, семенные каналы содержат все типы клеток, включая сперматозоиды

Полученные данные согласуются с результатами изучения влияния атразина на гонады неполовозрелых леопардовых лягушек (*Rana pipiens* Schreber, 1782) на территории США. Авторами было показано неравномерное развитие гонад, при котором часть

органа даже внешне сходна по строению с яичником. Другая часть в своем строении наряду с семенными канальцами содержит ооциты [Hayes et al, 2003].

Учитывая то, что половое развитие регулируется не только генетическими, но и гормональными факторами, причиной появления гермафродитной особи озерной лягушки на территории Екатеринбурга, вероятно, стало влияние внешних антропогенных факторов: присутствие гормональных деструкторов в водоеме.

Результаты нашего исследования, несомненно, следует считать предварительными. Но они диктуют необходимость продолжения проведения полевых исследований по изучению воздействия комплекса факторов антропогенной дестабилизации среды, включая возможное влияние гормональных деструкторов на амфибий. На данном этапе исследования мы можем высказать определенные предположения. В зависимости от уровня антропогенной нагрузки количество аномальных сперматозоидов (измененная форма головки) у озерной лягушки изменяется незначительно. Размер головок сперматозоидов у озерной лягушки, вероятно, можно отнести к достаточно чувствительным к неблагоприятному воздействию параметров. Причина появления гермафродитной особи озерной лягушки на территории ЦПКиО, вероятно, связана с действием урбанизации и требует проведения дополнительных исследований.

### Библиографические ссылки

Вершинин В. Л., Середюк С. Д., Черноусова Н. Ф., Толкачев О. В., Силс Е. А., 2006. Пути адаптациогенеза наземной фауны к условиям техногенных ландшафтов. Екатеринбург : УрО РАН, Банк культурной информации. 182 с.

Мамина В. П., Жигальский О. А., 2006. Оценка оплодотворяющей способности сперматозоидов у рыжей полевки (*Clethrionomys glareolus*) на разных фазах динамики численности // Успехи современной биологии. Т. 126, № 4. С. 413–420.

Никитин А. И., 2008. Вредные факторы среды и репродуктивная система человека. СПб. : ЭЛБИ-СПб. 237с.

Du Preez L. H., Kunene N., Hanner R., Giesy J. P., Solomon K. R., Hosmer A., Van der Kraak G. J., 2009. Population-specific incidence of tes-

ticular ovarian follicles in *Xenopus laevis* from South Africa: A potential issue in endocrine testing // Aquatic Toxicology. Nr 95. P. 10–16.

Hayes T., Haston K., Tsui M., Hoang A., Haeffele C., Vonk A., 2003. Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): Laboratory and field evidence // Environmental Health Perspectives. Vol. 111. P. 568–575.

Hecker M., Giesy J. P., Jones P. D., Jooste A. M., Carr J. A., Solomon K. R., Smith E. E., Van Der Kraak G., Kendall R. J., du Preez., 2004. Plasma sex steroid concentrations and gonadal aromatase activities in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) from South Africa // Environmental Toxicology and Chemistry. Nr 23. P. 1996–2007.

McDaniel T. V., Martin P. A., Struger J., Sherry J., Marvin C. H., McMaster M. E., Clarence S., Tetraault G., 2008. Potential endocrine disruption of sexual development in free ranging male northern leopard frogs (*Rana pipiens*) and green frogs (*Rana clamitans*) from areas of intensive row crop agriculture // Aquatic Toxicology. Nr 88. P. 230–242.

Murphy M. B., Hecker M., Coady K. K., Tompsett A. R., Higley E. B., Jones P. D., Du Preez L. H., Solomon K. R., Carr J. A., Smith E. E., Kendall R. J., Van Der Kraak G., Giesy J. P., 2006. Plasma steroid hormone concentrations, aromatase activities and GSI in ranid frogs collected from agricultural and non-agricultural sites in Michigan (USA) // Aquatic Toxicology. Nr 77. P. 153–166.

Reeder A. L., Foley G. L., Nichols D. K., Hansen L. G., Wikoff B., Faeh S., Eisold J., Wheeler M. B., Warner R., Murphy J. E., Beasley V. R., 1998. Forms and prevalence of intersexuality and effects of environmental contaminants on sexuality in cricket frogs (*Acris crepitans*) // Environmental Health Perspectives. Nr 106. P. 261–266.

Skelly D. K., Susan R. Bolden & Kirstin B. Dion, 2010. Intersex Frogs Concentrated in Suburban and Urban Landscapes // EcoHealth. Vol. 7.1.3. P. 374–379.

Smith E. E., Du Preez L. H., Gentles A., Solomon K. R., Tandler B., Carr J. A., Van der Kraak G. L., Kendall R. J., Giesy J. P., Gross T. S., 2005. Assessment of laryngeal muscle and testicular cell types in *Xenopus laevis* (Anura Pipidae) inhabiting maize and non-maize growing areas of South Africa // African J. of Herpetology. Nr 54. P. 69–76.

Storrs-Mendez S. I., Semlitsch R. D., 2010. Intersex Gonads in Frogs: Understanding the Time Course of Natural Development and Role of Endocrine Disruptors // J. of Experimental Zoology Part B-Molecular and Developmental Evolution. 314B. P. 57–66.